

丁公藤注射液促进骨质疏松性大鼠骨折愈合的作用机制研究

史桂荣¹, 任博文², 张仲博², 王莉莎², 张啟威², 史栋梁^{2*} (1.商丘医学高等专科学校临床医学院中医教研室, 河南 商丘 476299; 2.河南省中医院骨病一科, 郑州 450000)

摘要: 目的 研究丁公藤注射液(injection erycibe, IE)对骨质疏松性大鼠骨折愈合的促进作用及其作用机制。方法 通过卵巢切除术和骨折术建立骨质疏松性骨折大鼠模型, 50 只健康 SD 大鼠(♀)随机分为假手术组、模型组和 1, 2, 4 mL·kg⁻¹ IE 组, 检测大鼠股骨骨密度、生物力学指标和血清钙、碱性磷酸酶含量, HE 染色观察大鼠骨骼病理组织学变化。对分离的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)进行药物干预, 分为对照组、5, 10, 20 mg·L⁻¹ IE 组、诱导组(成骨诱导培养基诱导分化)、NC siRNA 组、NCK1 siRNA 组、IE+NC siRNA 组和 IE+NCK1 siRNA 组, 采用 MTT 检测 MSCs 增殖, RT-qPCR 检测成骨分化相关基因 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* mRNA 水平, Western blotting 检测 NCK1 和 p-AKT 蛋白表达水平, 茜素红染色观察 MSCs 钙结节数量。结果 与模型组比较, 2, 4 mL·kg⁻¹ IE 组大鼠股骨骨密度、生物力学指标、血清生化指标均明显升高($P<0.05$), 且呈剂量依赖性, 4 mL·kg⁻¹ IE 组效果最佳。与对照组比较, 10, 20 mg·L⁻¹ IE 组 MSCs 增殖和成骨分化相关基因表达量明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), NCK1 和 p-AKT 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), MSCs 内钙结节量明显增加, 且呈剂量依赖性, 20 mg·L⁻¹ IE 组效果最佳。与 IE+NC siRNA 组比较, IE+NCK1 siRNA 组成骨分化相关基因表达量明显降低($P<0.01$), NCK1 和 p-AKT 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。结论 IE 通过促进 NCK1 蛋白表达, 激活 AKT 信号通路, 对骨质疏松性大鼠骨折愈合起到一定促进作用。

关键词: 丁公藤; 骨质疏松; 成骨分化; 酪氨酸激酶 1 的非催化区; 蛋白激酶 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)23-3079-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.23.005

引用本文: 史桂荣, 任博文, 张仲博, 等. 丁公藤注射液促进骨质疏松性大鼠骨折愈合的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(23): 3079-3085.

Study on the Mechanism of Injection Erycibe in Promoting Fracture Healing in Osteoporotic Rats

SHI Guirong¹, REN Bowen², ZHANG Zhongbo², WANG Lisha², ZHANG Qiwei², SHI Dongliang^{2*}
(1.Department of Traditional Chinese Medicine, College of Clinical, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476299, China;
2.Department of Orthopedics, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the promoting effect and mechanism of injection erycibe(IE) on fracture healing in osteoporotic rats. **METHODS** Castration and fracture surgery were used to establish a rat model of osteoporotic fracture. Fifty female healthy SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and 1, 2, 4 mL·kg⁻¹ IE group. The rat femur bone mineral density, biomechanical indicators, serum calcium and alkaline phosphatase levels were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of rat skeleton. The isolated bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) were intervened with drugs, which were divided into control group, 5, 10, 20 mg·L⁻¹ IE group, induction group(using osteogenic induction medium), NC siRNA group, NCK1 siRNA group, IE+NC siRNA group and IE+NCK1 siRNA group. MTT method was used to detect the proliferation of MSCs. RT-qPCR was used to detect the mRNA levels of osteogenic differentiation related genes *ALP*, *Runx2* and *Osterix*. Western blotting was used to detect the protein expression levels of NCK1 and p-AKT. Alizarin red staining was used to observe the number of calcium nodules in MSCs. **RESULTS** Compared with the model group, the bone mineral density, biomechanical indexes, and serum biochemical indexes of rats in 2, 4 mL·kg⁻¹ IE groups were significantly increased($P<0.05$) in a dose-dependent manner, and 4 mL·kg⁻¹ IE group had the best effect. Compared with the control group, the proliferation of MSCs and the expression of osteogenic differentiation-related genes in 10, 20 mg·L⁻¹ IE group were significantly increased($P<0.05$ or $P<0.01$), and the expression levels of NCK1 and p-AKT proteins were significantly increased($P<0.05$) and the amount of calcium nodules in MSCs was significantly increased in a dose-dependent manner. Moreover, the 20 mg·L⁻¹ IE group had the best effect. Compared with IE+NC siRNA group, the expression of bone differentiation-related genes *ALP*, *Runx2* and *Osterix* mRNA were significantly decreased($P<0.01$), the expression levels of NCK1 and p-AKT proteins were significantly decreased($P<0.01$) in IE+NCK1 siRNA group. **CONCLUSION** EI can promote

作者简介: 史桂荣, 女, 硕士, 副教授
gqgalbert@sina.com

E-mail: 2996083784@qq.com

*通信作者: 史栋梁, 男, 硕士, 副主任医师

E-mail:

fracture healing in osteoporotic rats by promotes the expression of NCK1 protein and activates the AKT signaling pathway.

KEYWORDS: erycibe; osteoporosis; osteogenic differentiation; non-catalytic domain of tyrosine kinase 1; protein kinase B

由于骨质疏松患者骨骼骨转换增加、骨量减少和骨骼脆弱等特征,导致骨折风险增加和骨伤难以愈合^[1]。目前,中医药用于骨折治疗已变得越来越普遍,可通过中医疏通经络和消肿化瘀的方法促进骨折的愈合。丁公藤注射液(injection erycibe, IE)临床主要用于消肿和镇痛^[2],其对于骨折的治疗尚无明确报道。有研究显示,丁公藤的主要活性成分香豆素衍生物具有促进骨折愈合的作用^[3-4]。酪氨酸激酶接头蛋白 1 的非催化区域(non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1, NCK1)是一种适配器蛋白。有研究报道 NCK1 可通过调节骨量以促进骨损伤修复^[5]。在人脐静脉内皮细胞中,ABL 原癌基因通过促进 NCK1 的磷酸化抑制血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)的自磷酸化,从而抑制细胞迁移^[6]。此外,有研究发现丁公藤提取物可阻断 VEGFR-2 的自磷酸化而抑制人脐静脉内皮细胞的管形成、增殖和迁移^[7]。因此,笔者推测丁公藤提取物可能与 NCK1 存在调控关系。本研究拟探讨 IE 对骨质疏松性大鼠骨折愈合的作用并阐明其潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

60 只健康 SD 大鼠,♀,8 周龄左右,体质量在 230~270 g,购自河南中医药大学第一附属医院。动物生产许可证号:SCXK(豫)2017-0001。动物实验经河南中医药大学附属河南省中医院动物实验伦理委员会批准(批准号:HX/ZYY-2017003)。

1.2 试剂与仪器

IE(鲁南贝特制药有限公司,规格:每支 2 mL/100 mg;批号:20050512;国药准字 Z37020306);血清钙、磷和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒以及 ECL 发光液均购自美国 Thermo Fisher Scientific,批号分别为 mL095090, mL095095, mL095176, mL095429;鼠抗兔多克隆 NCK1(货号:ab129367)、AKT(货号:ab8805)、p-AKT(货号:ab38449)和 β -actin 抗体(货号:ab6276)购自英国 Abcam 公司;NC siRNA 和 NCK1 siRNA 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 染色液(大连 Takara Biotechnology 公司,货号:MK400);茜素

红(西亚试剂,批号:Al2285-25g);BCA 试剂盒(美国 Elabscience 公司,货号:E-BC-K318-M)。

DEXA 骨密度检测仪(南通广创医疗器械有限公司);ZF-258 全自动凝胶成像分析系统(广州瑞丰实验设备有限公司);ELX800 酶标仪(美国 BioTek 公司);CR30NX 离心机(德国 Eppendorf 公司);InAlyzer 双能 X 射线骨密度仪(韩国 Medikors 公司);Catalyst One 全自动生化分析系统(英国 EDEXX 公司);QX-W600 万能生物力学试验机(上海企想检测仪器有限公司)。

1.3 动物模型制备及给药

将 50 只大鼠随机分为假手术组、模型组和 1, 2, 4 mL $\cdot$ kg⁻¹ IE 组,每组 10 只。用 10% 水合氯醛(5 mL $\cdot$ kg⁻¹)对大鼠进行腹腔注射麻醉,手术摘除卵巢后用丝线将伤口结扎。卵巢摘除后观察培养 4 周,从大鼠右侧股骨中段处纵形切开皮肤,切口约 2 cm,暴露并固定股骨,在股骨干中段约 1/3 处锯断成横行骨折,再用直径为 1.5 mm 的克氏针逆行刺入骨折近端,并且从后侧的股骨大转子处穿出,用生理盐水冲洗后缝合伤口。大鼠术后能正常行走则为建模成功,假手术组大鼠仅暴露卵巢不摘除。1, 2, 4 mL $\cdot$ kg⁻¹ IE 组大鼠建模后每日皮下注射 1, 2, 4 mL $\cdot$ kg⁻¹ IE,持续 4 周。假手术组和模型组大鼠每日皮下注射同体积的 0.9% 生理盐水,持续 4 周。

1.4 双能 X 线骨密度仪检测大鼠股骨骨密度

给药结束后处死大鼠,截取右股骨骨折端的骨髓组织长为 1~2 cm 左右,使用双能 X 线吸收扫描仪测骨密度,划定中心区域,运用小物体扫描模式(分辨率 1.0 mm $\times$ 1.2 mm,扫描速度 50 mm $\cdot$ s⁻¹,扫描宽度 2.0 cm)。

1.5 3 点弯曲试验检测各组大鼠股骨生物力学

骨密度值测定结束后,截取各组骨质疏松大鼠右侧股骨,放于生物力学测试机,找股骨中点为施压点,在骨折处加压,加压速度为 2 mm $\cdot$ min⁻¹,使用计算机记录和计算股骨最大载荷、弹性模量和刚度。

1.6 ELISA 测定血清生化指标

在大鼠药物干预的最后 1 d,以仰卧位将大鼠固定在解剖固定板上,采集大鼠心脏血液 5 mL,放置 4 h 后,以 1 900 $\times$ g 离心 10 min,分离血清。使用 ELISA 对血清进行检测,分别按照 ALP 活性

测定试剂盒、钙测定试剂盒和磷测定试剂盒说明书操作,检测血清中钙和磷含量以及 ALP 活性。

1.7 骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分离、培养及处理

3 只大鼠摘除卵巢 4 周后,断头处死,在无菌操作台中取出股骨,使用不含血清的 DMEM 液冲洗骨髓腔,将洗液反复吹打使之成单细胞悬液,转入无菌离心管,2 800 × g,离心 10 min,去上清,沉淀用 Hank's 液洗涤 2 次,将细胞转入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,3 d 换 1 次液,待细胞长至 80%进行传代,用 250 μL Taq 胰酶消化细胞 1 min,细胞传 3 代之后开始实验。对照组细胞加入等体积 0.1% DMSO; 5, 10, 20 mg·L⁻¹ IE 组分别加入相应浓度 IE 孵育细胞 48 h; NC siRNA 和 NCK1 siRNA 组细胞分别转染 40 nmol·L⁻¹ NC siRNA 或 40 nmol·L⁻¹ NCK1 siRNA; IE+NC siRNA 和 IE+NCK1 siRNA 组细胞于 20 mg·L⁻¹ IE 孵育 48 h 后分别与 40 nmol·L⁻¹ NC siRNA 或 40 nmol·L⁻¹ NCK1 siRNA 干扰 24 h; 诱导组细胞使用含 5%胎牛血清、10 nmol·L⁻¹ 地塞米松、10 mmol·L⁻¹ β-甘油磷酸酯和 50 mg·L⁻¹ 抗坏血酸的成骨培养基诱导细胞成骨分化。

1.8 MTT 检测 MSCs 增殖

在细胞培养的第 4, 8, 12 天分别加入 20 μL 5 g·L⁻¹ MTT, 于 37 °C 孵育 4 h, 吸出培养液并加入 150 μL DMSO, 待结晶全部溶解后, 使用酶标仪测 OD 值, 检测波长为 570 nm。

1.9 RT-qPCR 检测 MSCs 中 ALP、Runx2 和 Osterix mRNA 水平

使用 TRIzol 试剂按照说明书提取细胞的总 RNA。使用 TaqMan 试剂盒将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA, PCR 反应条件: 95 °C 5 min、35 个循环(95 °C 30 s、55 °C 30 s 以及 72 °C 1 min)和 72 °C 延伸 10 min。用 SYBR Green Mater Mix 试剂检测待检基因的 mRNA 水平, 重复检测 3 次, mRNA 水平以 β-actin 为内参。基因的 PCR 引物序列结果见表 1。

表 1 扩增基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequence of the amplified gene

基因	前引物	后引物
ALP	ATCGGTACCTGTTTGGCCAG	TGATGACGTTCTTAGCCACG
Runx2	AGCCCTCGGAGAGGTACCA	TCATCGTTACCCGCCATGA
Osterix	ATCCATGCAGGCATCTCACC	ACCTAACCAATTGCCCCACG
β-actin	AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT	AGGTAGTTTCGTGAATGCCG

1.10 Western blotting 检测 MSCs 中 NCK1、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平

使用 RIPA 裂解液裂解细胞并提取总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定样品蛋白浓度。电泳结束后用蛋白转膜仪将蛋白转印至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶将膜封闭 1 h, TBST 洗膜完成后, 用一抗 NCK1(1 : 500 稀释)、AKT(1 : 500 稀释)、p-AKT(1 : 500 稀释)和 β-actin(1 : 1 000 稀释)4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入对应的二抗(1 : 2 000 稀释)室温孵育 2 h, 洗膜完成后在 ECL 中显色。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参 β-actin 条带灰度值。

1.11 茜素红染色

细胞培养第 12 天时, 分别对各组细胞进行茜素红染色, 在光镜下进行观察, 以是否深染、边界是否清晰、周围是否有明显细胞堆积和短径是否 >10 μm 为标准对细胞进行计数, 染色之后对每张爬片进行低倍视野观察记录钙结节沉积。

1.12 统计学分析

本研究所有数据均使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析及 Tukey's 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨骼组织形态学的比较

HE 染色试验结果显示, 假手术组可见大量成熟骨组织, 骨小梁生长旺盛, 交错排列呈网状; 模型组见大量纤维组织, 骨小梁稀疏纤细, 排列紊乱, 间隙增宽, 骨密质变薄; 与模型组比较, 1, 2 mL·kg⁻¹ IE 组骨小梁变粗变密, 骨密质增厚, 4 mL·kg⁻¹ IE 组骨细胞排列整齐, 骨小梁结构紧密, 骨的连续性好, 骨密质较厚且均匀。结果见图 1。

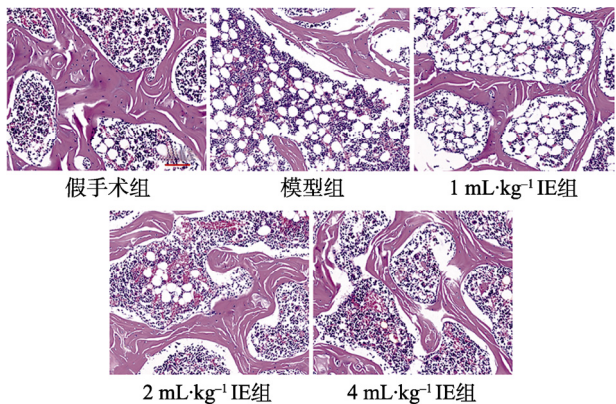


图 1 各组大鼠骨骼组织 HE 染色图(200×)

Fig. 1 HE staining diagram of rats' bone tissue in each group(200×)

2.2 IE 对各组大鼠股骨骨密度、生物力学指标和血清生化指标的影响

与假手术组比较,模型组大鼠股骨骨密度、最大载荷和抗弯强度均明显降低($P<0.05$);与模型组比较,2,4 mL·kg⁻¹ IE 组大鼠的股骨骨密度、最大载荷和抗弯强度均明显升高($P<0.05$),且作用呈剂量关系,结果见表2。

表2 大鼠股骨骨密度、生物力学分析($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Tab. 2 Bone mineral density and biomechanical analysis of rat femur($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	骨密度	最大载荷/N	抗弯强度/N·mm ⁻¹
假手术组	0.27±0.01	265.42±23.11	179.45±16.67
模型组	0.13±0.02 ¹⁾	134.80±17.65 ¹⁾	105.43±14.54 ¹⁾
1 mL·kg ⁻¹ IE 组	0.17±0.01 ¹⁾	159.54±18.33 ¹⁾²⁾	117.86±17.36 ¹⁾²⁾
2 mL·kg ⁻¹ IE 组	0.21±0.01 ²⁾	187.12±16.57 ¹⁾²⁾³⁾	168.12±15.74 ¹⁾²⁾³⁾
4 mL·kg ⁻¹ IE 组	0.23±0.02 ²⁾³⁾	201.43±20.36 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	184.45±21.96 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:与假手术组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比,²⁾ $P<0.05$;与1 mL·kg⁻¹ IE 组相比,³⁾ $P<0.05$;与2 mL·kg⁻¹ IE 组相比,⁴⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with sham operation group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with 1 mL·kg⁻¹ IE group, ³⁾ $P<0.05$; compared with 2 mL·kg⁻¹ IE group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

与假手术组比较,模型组大鼠血清钙和磷浓度以及 ALP 活性明显降低($P<0.05$);与模型组比较,1,2,4 mL·kg⁻¹ IE 组大鼠血清钙和磷浓度以及 ALP 活性明显升高($P<0.05$),且作用呈剂量关系,结果见表3。

表3 各组大鼠血清生化指标水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Tab. 3 Comparison of serum biochemical indicators in various groups of rats($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	钙/mmol·L ⁻¹	磷/mmol·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹
假手术组	2.87±0.25	3.57±0.36	126.53±11.7
模型组	1.72±0.19 ¹⁾	2.41±0.28 ¹⁾	182.25±9.5 ¹⁾
1 mL·kg ⁻¹ IE 组	1.93±0.16 ¹⁾²⁾	2.85±0.17 ¹⁾²⁾	164.59±12.6 ¹⁾²⁾
2 mL·kg ⁻¹ IE 组	2.10±0.23 ¹⁾²⁾³⁾	3.06±0.15 ¹⁾²⁾³⁾	141.35±13.65 ¹⁾²⁾³⁾
4 mL·kg ⁻¹ IE 组	2.37±0.21 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	3.27±0.29 ²⁾³⁾	133.76±8.4 ²⁾³⁾⁴⁾

注:与假手术组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比,²⁾ $P<0.05$;与1 mL·kg⁻¹ IE 组相比,³⁾ $P<0.05$;与2 mL·kg⁻¹ IE 组相比,⁴⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with sham operation group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with 1 mL·kg⁻¹ IE group, ³⁾ $P<0.05$; compared with 2 mL·kg⁻¹ IE group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

2.3 IE 对各组 MSCs 增殖和成骨分化的影响

与对照组比较,分别以5,10,20 mg·L⁻¹ IE 孵育细胞后,第8,12天细胞的增殖量均明显升高($P<0.05$),且 IE 浓度增加后,细胞的增殖量随之增加($P<0.05$)。与对照组比较,诱导组的细胞增殖量在孵育第4,8,12天显著增加($P<0.05$),结果见表4。

与对照组比较,10,20 mg·L⁻¹ IE 组 ALP、Runx2 和 Osterix mRNA 的表达量均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且 IE 浓度增加后,基因的表达量随之增加($P<0.05$)。与对照组比较,诱导组 ALP、Runx2 和 Osterix 的表达量均明显升高($P<0.01$),结果见表5。

茜素红染色图表明,与对照组比较,IE 处理组细胞钙结节量逐渐增加。结果见图2。

表4 MTT 检测各组 MSCs 增殖($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Tab. 4 Proliferation of MSCs in various groups detected by MTT($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	第4天	第8天	第12天
对照组	0.50±0.06	0.94±0.1	1.21±0.09
5 mg·L ⁻¹ IE 组	0.64±0.05	1.17±0.09	1.44±0.08 ¹⁾
10 mg·L ⁻¹ IE 组	0.81±0.05 ¹⁾²⁾	1.25±0.12 ¹⁾²⁾	1.63±0.17 ¹⁾²⁾
20 mg·L ⁻¹ IE 组	0.87±0.07 ¹⁾²⁾	1.44±0.24 ¹⁾²⁾³⁾	1.76±0.19 ¹⁾²⁾³⁾
诱导组	0.83±0.09 ¹⁾²⁾	1.47±0.22 ¹⁾²⁾³⁾	1.71±0.21 ¹⁾²⁾³⁾

注:与对照组相比,¹⁾ $P<0.05$;与5 mg·L⁻¹ IE 组相比,²⁾ $P<0.05$;与10 mg·L⁻¹ IE 组相比,³⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with 5 mg·L⁻¹ IE group, ²⁾ $P<0.05$; compared with 10 mg·L⁻¹ IE group, ³⁾ $P<0.05$ 。

表5 各组 MSCs 中成骨细胞标志基因 ALP、Runx2 和 Osterix mRNA 的表达量($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Tab. 5 Expression of osteoblast marker genes ALP, Runx2 and Osterix mRNA in various groups of MSCs($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	ALP	Runx2	Osterix
对照组	1.00±0.05	0.95±0.01	1.08±0.02
5 mg·L ⁻¹ IE 组	1.27±0.06 ¹⁾	1.13±0.05	1.84±0.12 ¹⁾
10 mg·L ⁻¹ IE 组	2.03±0.11 ¹⁾³⁾	1.96±0.08 ¹⁾³⁾	2.45±0.16 ²⁾³⁾
20 mg·L ⁻¹ IE 组	3.14±0.15 ²⁾³⁾⁴⁾	2.57±0.13 ²⁾³⁾⁴⁾	3.68±0.25 ²⁾³⁾⁴⁾
诱导组	3.29±0.21 ²⁾³⁾⁴⁾	3.16±0.15 ²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	3.75±0.23 ²⁾³⁾⁴⁾

注:与对照组相比,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与5 mg·L⁻¹ IE 组相比,³⁾ $P<0.05$;与10 mg·L⁻¹ IE 组相比,⁴⁾ $P<0.05$;与20 mg·L⁻¹ IE 组相比,⁵⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with 5 mg·L⁻¹ IE group, ³⁾ $P<0.05$; compared with 10 mg·L⁻¹ IE group, ⁴⁾ $P<0.05$; compared with 20 mg·L⁻¹ IE group, ⁵⁾ $P<0.05$ 。

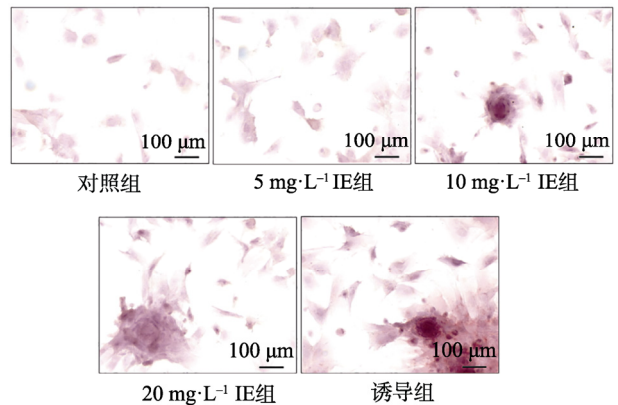


图2 IE 孵育后各组 MSCs 茜素红染色图(100×)
Fig. 2 Alizarin red staining image of MSCs in each group after incubation with IE injection(100×)

2.4 IE 对 MSCs 中 NCK1、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平的影响

5, 10, 20 mg·L⁻¹ IE 孵育细胞后, 检测 NCK1、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平。结果显示, 与对照组比较, 5, 10, 20 mg·L⁻¹ IE 组 NCK1 和 p-AKT 蛋白的表达均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且呈剂量关系, 20 mg·L⁻¹ IE 组的 NCK1 和 p-AKT 蛋白表达水平最高; 各组间 AKT 蛋白的表达差异均无统计学意义。结果见图 3。

2.5 IE 调控 NCK1 对各组 MSCs 成骨分化的影响

与 NC siRNA 组比较, NCK1 siRNA 组 NCK1 和 p-AKT 蛋白的表达均明显降低($P<0.05$), IE+NC siRNA 组 NCK1 和 p-AKT 蛋白的表达均明显升高($P<0.01$)。与 NCK1 siRNA 组比较, IE+NCK1 siRNA 组 NCK1 和 p-AKT 蛋白的表达均明显升高($P<0.05$)。与 IE+NC siRNA 组比较, IE+NCK1 siRNA 组 NCK1 和 p-AKT 蛋白的表达均明显降低($P<0.01$)。结果见图 4。

RT-qPCR 试验结果显示, 与 NC siRNA 组比较, NCK1 siRNA 组 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* mRNA

的表达量均明显降低($P<0.05$), IE+NC siRNA 组 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* mRNA 的表达量均明显升高($P<0.01$)。与 NCK1 siRNA 组比较, IE+NCK1 siRNA 组 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* mRNA 的表达量均明显升高($P<0.05$)。与 IE+NC siRNA 组比较, IE+NCK1 siRNA 组 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* mRNA 的表达量均明显降低($P<0.01$)。结果见表 6。

表 6 IE 孵育后各组 MSCs 中成骨细胞标志基因 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* mRNA 的表达量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Expression of osteoblast marker genes *ALP*, *Runx2* and *Osterix* mRNA of MSCs after incubation with IE injection in various groups($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	<i>ALP</i>	<i>Runx2</i>	<i>Osterix</i>
NC siRNA 组	1.00±0.05	1.04±0.01	1.05±0.02
NCK1 siRNA 组	0.75±0.04 ¹⁾	0.82±0.05 ¹⁾	0.78±0.08 ¹⁾
IE+NC siRNA 组	3.02±0.17 ²⁾	2.54±0.15 ²⁾	3.55±0.23 ²⁾
IE+NCK1 siRNA 组	1.05±0.12 ³⁾⁴⁾	1.08±0.09 ³⁾⁴⁾	1.17±0.14 ³⁾⁴⁾

注: 与 NC siRNA 组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 NCK1 siRNA 组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与 IE+NC siRNA 组相比, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with NC siRNA group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with NCK1 siRNA group, ³⁾ $P<0.05$; compared with IE+NC siRNA group, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

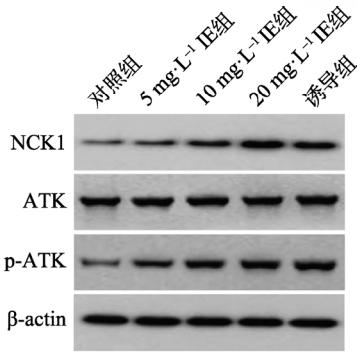


图 3 IE 对各组 MSCs 中 NCK1、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平的影响

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 5 mg·L⁻¹ IE 组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与 10 mg·L⁻¹ IE 组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of IE on the protein expression levels of NCK1, AKT and p-AKT in MSCs of each group

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with 5 mg·L⁻¹ IE group, ³⁾ $P<0.05$; compared with 10 mg·L⁻¹ IE group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

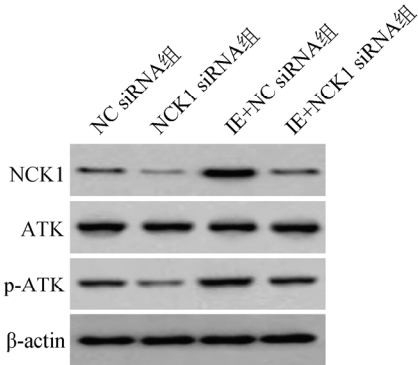
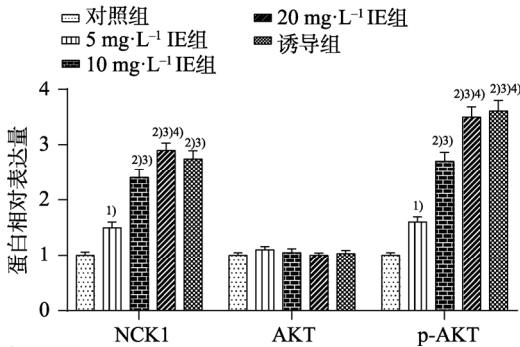
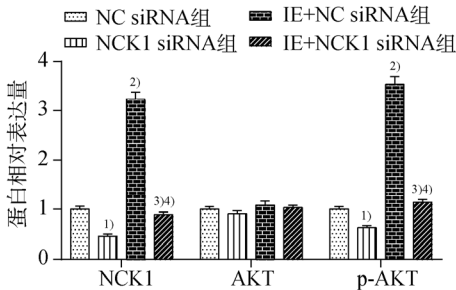


图 4 NCK1 干扰对各组 MSCs 中 NCK1、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平的影响

与 NC siRNA 组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 NCK1 siRNA 组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与 IE+NC siRNA 组相比, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of NCK1 interference on the protein expression levels of NCK1, AKT and p-AKT in MSCs of each group

Compared with NC siRNA group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with NCK1 siRNA group, ³⁾ $P<0.05$; compared with IE+NC siRNA group, ⁴⁾ $P<0.01$ 。



3 讨论

随着中国人口老龄化的不断扩大和近年来生活方式的变化,骨质疏松性骨折的患病率激增^[8]。目前治疗骨质疏松症的药物较多,主要包括基础补充剂(骨矿化药物,如钙、维生素D等)、骨吸收抑制剂(如双膦酸盐、狄诺塞麦等)、骨形成促进剂、其他机制药物、中药等^[9]。而西药治疗骨质疏松有较大的不良反应和依赖性。例如抑制破骨细胞骨吸收的双膦酸盐被认为是治疗骨质疏松症的一线药物,而其和狄诺塞麦都与下颌骨坏死和非典型股骨干骨折有关^[10]。中药以其独特的优势被越来越多地用于骨质疏松性骨折的治疗,且临床效果显著^[11]。如骨碎补和淫羊藿均被报道可用于治疗骨质疏松症,且尚未发现明显的不良反应和毒性^[12]。骨折后 MSCs 立即迁移到骨折部位,并分化为成骨细胞和破骨细胞,使骨折得到恢复^[13]。然而,有研究表明,骨质疏松患者由于 MSCs 的信号转导功能受损,可能对愈合组织形成、软骨内成骨和 MSCs 分化产生负面影响,最终导致愈合缓慢^[14]。因此,提高 MSCs 成骨性分化可作为一条有效的治疗途径。通过研究 IE 是否能促进 MSCs 的成骨分化及在此过程中具体分子机制,可为骨质疏松性骨折的治疗和预防提供新思路。

IE 属于旋花科植物,主要被用于治疗关节痛和类风湿性关节炎^[15]。IE 的乙醇提取物主要包括东莨菪内酯、东莨菪苷和绿原酸,其中东莨菪内酯和东莨菪苷均被报道可通过抑制炎症和血管生成抑制佐剂诱导的大鼠关节炎^[16]。有研究表明 IE 提取物可通过增强成骨细胞中骨形成蛋白-2、骨钙素和碱性磷酸酶的表达,促进骨质疏松性骨折愈合^[4,17]。本研究对建立的骨质疏松性骨折模型 SD 大鼠注射不同剂量的 IE(1, 2, 4 mL·kg⁻¹),显示其可明显提高大鼠股骨的骨密度、生物力学指标和血清生化指标。将分离培养的 MSCs 与不同浓度 IE 孵育,结果显示,随着 IE 浓度的增加, MSCs 增殖和成骨分化相关基因 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* 的表达量逐渐升高。此外,笔者发现 IE 可促进 MSCs 中 NCK1 蛋白的表达水平。

NCK1 是一种适配器蛋白,有研究发现 NCK1 过表达促进 MSCs 的迁移和侵袭^[5],且 NCK1 可能与骨质疏松性骨折密切相关^[18]。在人脐静脉内皮细胞中,IE 抑制细胞增殖和迁移可能与 NCK1 磷酸化水平升高有关^[6-7]。此外,有研究发现 AKT

信号通路激活可促进 MSCs 的成骨分化^[19]。有研究报道在肝癌细胞中 NCK1 沉默可导致 AKT 信号转导受抑制^[20]。本研究发现 IE 可促进 MSCs 中 p-AKT 蛋白的表达。而 NCK1 下调后, p-AKT 蛋白表达水平降低,且成骨分化相关基因 *ALP*、*Runx2* 和 *Osterix* 的表达量随之降低, MSCs 内钙结节量也相应减少。

本研究通过建立大鼠骨质疏松性骨折模型和分离培养原代 MSCs,初步证实 IE 可促进骨质疏松性大鼠骨折愈合, MSCs 增殖和成骨分化。此外,本研究还证实了 IE 可通过促进 NCK1 蛋白表达,活化 AKT,促进 MSCs 成骨分化。研究表明 IE 在预防和治疗骨质疏松性骨折方面有较好的开发前景。

REFERENCES

- [1] ARCEO-MENDOZA R M, CAMACHO P. Prediction of fracture risk in patients with osteoporosis: A brief review[J]. *Womens Health (Lond)*, 2015, 11(4): 477-482;quiz483-4.
- [2] YE W B, JIANG F, DING S P, et al. Effects of injection *Erycibe* on the sciatic nerve of bullfrog[J]. *J Shanghai Teach Univ(上海师范大学学报: 自然科学版)*, 1999, 28(1): 82-88.
- [3] ZHOU Y, ZENG T, LI L M. Phenolic constituents from *Erycibe schmidtii*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2016, 47(9): 1496-1500.
- [4] LEE E J, KANG M K, KIM Y H, et al. Coumarin ameliorates impaired bone turnover by inhibiting the formation of advanced glycation end products in diabetic osteoblasts and osteoclasts[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(7): 1052.
- [5] SMRITI A A C, MIYAI K, IZU Y, et al. Nck influences preosteoblastic/osteoblastic migration and bone mass[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(50): 15432-15437.
- [6] ANSELMINI F, ORLANDINI M, ROCCHIGIANI M, et al. C-ABL modulates MAP kinases activation downstream of VEGFR-2 signaling by direct phosphorylation of the adaptor proteins GRB2 and NCK1[J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(2): 187-197.
- [7] PAN R, DAI Y, GAO X H, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by scopoletin through interrupting the autophosphorylation of VEGF receptor 2 and its downstream signaling pathways[J]. *Vasc Pharmacol*, 2011, 54(1/2): 18-28.
- [8] YU F, XIA W B. The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China[J]. *Arch Osteoporos*, 2019, 14(1): 32.
- [9] YONG E L, LOGAN S. Menopausal osteoporosis: Screening, prevention and treatment[J]. *Singapore Med J*, 2021, 62(4): 159-166.
- [10] AN H Q, ZHAO J F, WANG J H, et al. Comparison of efficacy and safety of Chinese patent medicine in the treatment of postmenopausal osteoporosis: A protocol for systematic review and network meta-analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(42): 159-166.

- e22734.
- [11] HUANG F C. PKP surgical treatment of osteoporotic vertebral compression fractures to observe the curative effect after application of Zhuanggu Huoxue Decoction[D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [12] GAN D H, XU X W, CHEN D Q, et al. Network pharmacology-based pharmacological mechanism of the Chinese medicine rhizoma drynariae against osteoporosis[J]. Med Sci Monit, 2019(25): 5700-5716.
- [13] ZHANG L H, MIRAMINI S, RICHARDSON M, et al. The role of impairment of mesenchymal stem cell function in osteoporotic bone fracture healing[J]. Australas Phys Eng Sci Med, 2017, 40(3): 603-610.
- [14] HAASTERS F, DOCHEVA D, GASSNER C, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(1): 118-123.
- [15] CHOI J Y, LEE J W, JANG H, et al. Quinic acid esters from *Erycibe obtusifolia* with antioxidant and tyrosinase inhibitory activities[J]. Nat Prod Res, 2021, 35(18): 3026-3032.
- [16] CHEN Z Y, LIAO L P, ZHANG Z J, et al. Comparison of active constituents, acute toxicity, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Porana sinensis* Hemsl., *Erycibe obtusifolia* Benth. and *Erycibe schmidtii* Craib[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(2): 501-506.
- [17] ZHANG Z R, LEUNG W N, LI G, et al. Osthole promotes endochondral ossification and accelerates fracture healing in mice[J]. Calcif Tissue Int, 2016, 99(6): 649-660.
- [18] LI T, LIU W B, TIAN F F, et al. Gender-specific SBNO₂ and VPS13B as a potential driver of osteoporosis development in male ankylosing spondylitis[J]. Osteoporos Int, 2021, 32(2): 311-320.
- [19] WU Y, WANG M M, ZHANG K F, et al. Lactate enhanced the effect of parathyroid hormone on osteoblast differentiation via GPR81-PKC-Akt signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(2): 737-743.
- [20] LI H, LI B, LAROSE L. IRE1 α links Nck1 deficiency to attenuated PTP1B expression in HepG2 cells[J]. Cell Signal, 2017(36): 79-90.
- 收稿日期: 2021-12-14
(本文责编: 蔡珊珊)